



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 14 940 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 02 B 21/00**

⑳ Aktenzeichen: P 44 14 940.9  
㉔ Anmeldetag: 28. 4. 94  
㉕ Offenlegungstag: 2. 11. 95

DE 44 14 940 A 1

㉑ Anmelder:  
Hänninen, Pekka, Turku, FI; Hell, Stefan, Dr., 69117  
Heidelberg, DE

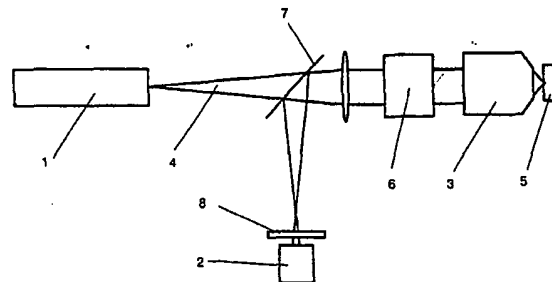
㉒ Vertreter:  
Tegel-Küppers, L., Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anw.,  
82024 Taufkirchen

㉓ Erfinder:  
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Lumineszenz-Rastermikroskopie und ein Lumineszenz-Rastermikroskop

⑤⑦ Es wird ein Rastermikroskop mit einer Laser-, einer Filter- und einer Detektoranordnung beschrieben. Die Lumineszenz einer zu untersuchenden Probe (5) wird durch die Laseranordnung (1) in Form einer Zwei-Photonen Anregung angeregt. Das Lumineszenzlicht der Probe (5) wird von dem Laserlicht (4) durch die Filteranordnung (7, 8) separiert und durch die Detektoranordnung (2) registriert. Aus Gründen einer verringerten Probenbelastung ist die maximal abgegebene Laserleistung zugunsten der Probenbestrahlungszeit verringert und die Laseranordnung (1) hierzu das Laserlicht (4) entweder kontinuierlich oder in Form von Pulsen mit einer Pulsdauer größer oder gleich einer Pikosekunde abgibt.



DE 44 14 940 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Lumineszenz-Rastermikroskopie gemäß dem Oberbegriff des Hauptanspruches und ein Lumineszenz-Rastermikroskop zur Durchführung dieses Verfahrens.

Ein derartiges Verfahren ist aus der US PS 5034613 bekannt. Bei dem beschriebenen Verfahren handelt es sich um ein Verfahren mit Zwei-Photonenanregung. Ein zu untersuchendes Objekt, vorzugsweise ein biologisches Objekt wird mit einem lumineszierenden, insbesondere fluoreszierenden Farbstoff versehen. Der im Objekt befindliche Farbstoff wird durch die gemeinsame Wirkung von zwei Photonen angeregt und das vom Farbstoff emittierte Licht mittels eines Detektors registriert und ausgewertet. Um die gesamte Probe zu erfassen, wird der Laserstrahl über das Objekt gerastert. Die Werte von allen Punkten des Objektes werden registriert, wodurch eine dreidimensionale Darstellung der Auswerteergebnisse möglich ist. Die Zwei-Photonenanregung in Verbindung mit dem Rastern führt zu einer direkten dreidimensionalen Abbildung des Objektes. Um die Wahrscheinlichkeit der Zwei-Photonenanregung zu erhöhen, werden Laserimpulse verwendet, deren Dauer im Sub-Piko Sekundenbereich liegt. Laser, die solche extrem kurzen Impulse erzeugen, sind sehr teuer. Darüber hinaus werden biologische Objekte durch die Impulse hoher Leistung oft zerstört. Eine Anregung des Objektes mit Laserimpulsen im Sub-Piko-Sekundenbereich führt oft dazu, daß das Lumineszenzsignal "zusammenbricht". Dieses "Zusammenbrechen" kann anschaulich als eine "Mikro-Explosion" dargestellt werden, die das Objektmaterial zerstört.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein gattungsgemäßes Verfahren so weiterzubilden, daß die oben genannten Nachteile nicht auftreten.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen 1—3 angegebenen Merkmale gelöst. Es wurde überraschend gefunden, daß eine Messung von Zwei-Photonen Lumineszenz mit Laserimpulsen von längerer Dauer oder sogar mit kontinuierlichem Licht möglich ist und zu guten Meßergebnissen führt. Durch die Anregung mit Laserimpulsen, deren Dauer größer ist als  $10^{-12}$  Sekunden oder durch die Anregung mit kontinuierlichem Licht sind die Leistungsspitzen im Anregungslicht soweit reduziert, daß eine Zerstörung des Objektes nicht auftritt. Ein sehr vorteilhafter Bereich der Impulsdauer liegt im Picosekunden-Bereich. Da die verwendeten Laserimpulse eine niedrigere Leistung aufweisen, als die Leistung im Sub-Picosekundenbereich, sind längere Meßzeiten in der Regel angebracht, wobei die Empfindlichkeit des verwendeten Detektors den Meßbedingungen angepaßt wird. Es hat sich herausgestellt, daß wenn als Auswertungsverfahren das Verfahren des Photonenzählens (Photon Counting) eingesetzt wird, dieses zu sehr guten Meßergebnissen führt. Besonders vorteilhaft ist es, wenn als Detektor eine Avalanche-Photodiode eingesetzt wird. Sogar mit kontinuierlichem Laserlicht mittlerer Leistung ist die Aufnahme und Auswertung der Meßergebnisse möglich. Bei einer entsprechend verlängerten Zeitdauer der Messung und der Wahl eines Detektors mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis sind die Ergebnisse mit denen des Verfahrens unter Verwendung von Laserimpulsen im Sub-Pikosekundenbereich vergleichbar.

Von besonderem Vorteil ist es, daß zur Durchführung des erfindungsgemäßen Meßverfahrens als Lichtquelle handelsübliche Laser mit kontinuierlicher oder gepulster

ter Strahlung eingesetzt werden können. Diese sind nicht teuer. Es können übliche Halbleiter- oder Gaslaser eingesetzt werden. Als Gaslaser eignen sich insbesondere HeNe-Laser und Krypton-Ion Laser. Die Laseranordnung kann auch arrayförmig ausgebildet sein. Die Benutzung von zwei oder drei Lasern zur Bestrahlung des gleichen Objektpunktes hat sich als besonders vorteilhaft herausgestellt.

Wie oben bereits ausgeführt, ist es wesentlich, daß zur Aufnahme und Auswertung des lumineszierenden Lichtes ein Detektor mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis eingesetzt wird. Von besonderer Bedeutung ist dabei, daß der eingesetzte Detektor eine entsprechend hohe Empfindlichkeit und ein kleines Eigenrauschen aufweist. Durch die arrayförmige Anordnung der Laser und Detektoren und die dadurch gegebene Bestrahlung und Messung von mehreren Rasterpunkten, ist die Möglichkeit gegeben, die Dauer des Verfahrens zu verkürzen.

Vorteilhaft ist, wenn dem Objekt eine Strahlrastereinrichtung vorgeordnet ist, wobei der Strahl über das Objekt gerastert wird.

Bei dem erfindungsgemäßen Lumineszenz-Rastermikroskop sind weiterhin Filter vorgesehen zum Separieren des von der Probe emittierten Lichtes von dem Laserlicht. Anstatt eines Filters kann auch ein Detektor eingesetzt werden, der die entsprechende Wellenlänge herausfiltert.

Eine schematische Darstellung eines Lumineszenz-Rastermikroskopes zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Fig. 1 wiedergegeben.

Das Lumineszenz-Rastermikroskop weist einen Laser 1 zur Erzeugung des Laserlichtes, einen Fotodetektor 2 zur Auswertung der Meßergebnisse und ein Objekt 3 zur Fokussierung des von der Laserlichtquelle 1 ausgesandten Laserstrahles 4 auf das zu untersuchende Objekt 5 auf. Der Laserstrahl 4 wird mit einer Strahlrastereinrichtung 6 zum Abrastern des Objektes 5 gesteuert. Ferner weist das Lumineszenz-Rastermikroskop Filter 7 und 8 zum Separieren des Laserlichtes 4 vom Lumineszenzlicht auf. Gemäß der Erfindung ist die Laserlichtquelle 1 als ein herkömmlicher Laser mit kontinuierlicher oder gepulster Strahlung ausgebildet. Die Laserlichtquelle 1 kann auch durch eine arrayförmige Anordnung von Lasern gebildet sein. Das gleiche trifft für den Fotodetektor 2 zu. Dieser kann entweder punkt- oder arrayförmig ausgebildet sein. Im Falle einer arrayförmigen Anordnung der Laser 1 und Detektoren 2 sind diese sowie der abzubildende Probenbereich in jeweils zueinander optisch konjugierten Ebenen zur gleichzeitigen Aufnahme von mehreren Rasterpunkten angeordnet.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Lumineszenz-Rastermikroskopie mit Zwei-Photonen Anregung, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, wobei ein Laserimpuls lumineszierende, insbesondere fluoreszierende Moleküle angeregt und das vom Objekt ausgesandte Lumineszenzlicht gemessen und ausgewertet wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der im Objekt (5) vorhandenen lumineszierenden Moleküle durch Laserimpulse erfolgt, deren Dauer größer ist als  $10^{-12}$  Sekunden.
2. Verfahren zur Lumineszenz-Rastermikroskopie mit Zwei-Photonen Anregung, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, wobei

ein Laserimpuls lumineszierende, insbesondere fluoreszierende Moleküle anregt und das vom Objekt ausgesandte Lumineszenzlicht gemessen und ausgewertet wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der im Objekt (5) vorhandenen lumineszierenden Moleküle durch Laserimpulse erfolgt, deren Dauer  $10^{-12}$  Sekunden ist.

3. Verfahren zur Lumineszenz-Rastermikroskopie mit Zwei-Photonen Anregung, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, wobei Laserlicht lumineszierende, insbesondere fluoreszierende Moleküle anregt und das vom Objekt ausgesandte Lumineszenzlicht gemessen und ausgewertet wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der im Objekt vorhandenen lumineszierenden Moleküle durch kontinuierliches Laserlicht erfolgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß das Auswerten des vom Objekt (5) ausgesandten Lumineszenzlichtes im Verfahren des Photonenzählens erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Rasterpunkte des Objektes (5) gleichzeitig angeregt werden und das von diesen Rasterpunkten ausgesandte Lumineszenzlicht gleichzeitig gemessen wird.

6. Lumineszenz-Rastermikroskop zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1, 2, 4 oder 5 mit mindestens einer Laserlichtquelle, mindestens einem Detektor, mindestens einem Filter zum Separieren des von der Probe emittierten Lichts von dem Laserlicht, dadurch gekennzeichnet, daß als Laserlichtquelle ein Laser (1) mit gepulster Strahlung dient.

7. Lumineszenz-Rastermikroskop zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 3 bis 5 mit mindestens einer Laserlichtquelle, mindestens einem Detektor, mindestens einem Filter zum Separieren des von der Probe emittierten Lichts von dem Laserlicht, dadurch gekennzeichnet, daß als Laserlichtquelle ein Laser (1) mit kontinuierlicher Strahlung dient.

8. Lumineszenz-Rastermikroskop nach Anspruch 6 oder 7 dadurch gekennzeichnet, daß der Laser ein Halbleiterlaser ist.

9. Lumineszenz-Rastermikroskop nach Anspruch 6 oder 7 dadurch gekennzeichnet, daß der Laser ein Gas-Laser ist.

10. Lumineszenz-Rastermikroskop nach Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet, daß der Laser ein He-Ne-Laser oder ein Krypton-Ion-Laser ist.

11. Lumineszenz-Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 6 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß ein Detektor (2) mit einem hohen Signal-Rauschverhältnis eingesetzt wird.

12. Lumineszenz-Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 6 bis 11 dadurch gekennzeichnet, daß eine Strahlrastereinrichtung (6) zum gesteuerten Abrastern des Objektes (5) vorgesehen ist.

13. Lumineszenz-Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 6 bis 12 dadurch gekennzeichnet, daß ein Array aus Laser (1) als Lichtquelle dient und ein Array aus Detektoren (2), die in einer optisch konjugierten Ebene zur Fokalebene des Objektes (5) angeordnet sind, verwendet wird.

14. Lumineszenz-Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 6 bis 13 dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor (2) eine Avalanche-Photodiode ist.

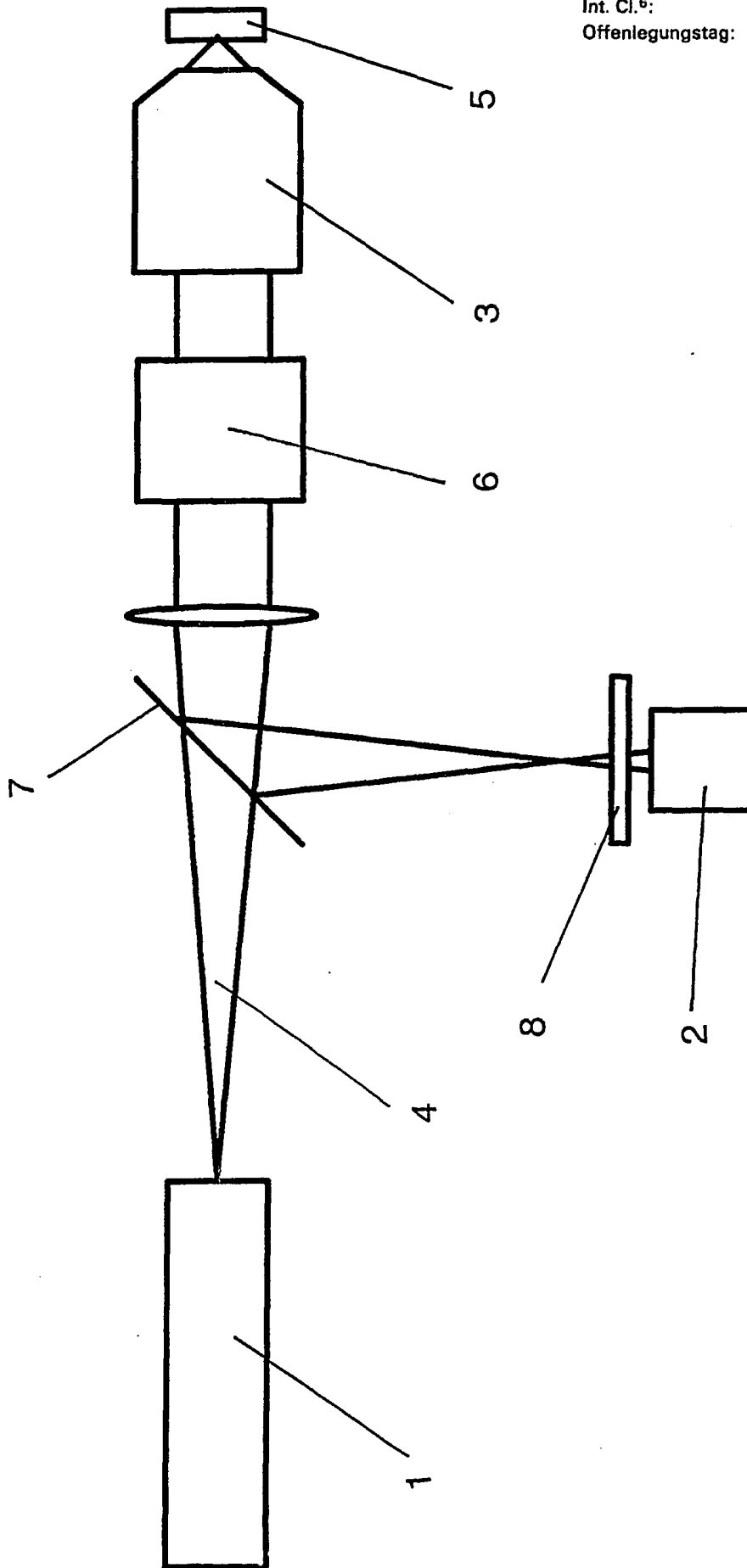


Fig. 1